

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局(43) 国际公布日:
2005年3月17日(17.03.2005)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2005/023277 A1(51) 国际分类号⁷: A61K 35/78, A61P 31/00

(21) 国际申请号: PCT/CN2003/000751

(22) 国际申请日: 2003年9月5日(05.09.2003)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 沈阳胜宝康生物制药有限公司(SHENYANG SUNBELL COM BIO-PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国辽宁省沈阳市东陵区文体东路7号, Liaoning 110015 (CN)。

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 张策(ZHANG, Ce) [CN/CN]; 张轶(ZHANG, Yi) [CN/CN]; 李军(LI, Jun) [CN/CN]; 洪晓明(HONG, Xiaoming) [CN/CN]; 中国辽宁省沈阳市东陵区文体东路7号, Liaoning 110015 (CN)。

(74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司(JEEKAI & PARTNERS); 中国北京市西城区宣武门西大街甲129号金隅大厦602室, Beijing 100031 (CN)。

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A RED NOCARDIA CELL WALL SKELETON PREPARATION PROCESS AND ITS THERAPEUTIC USE ON TREATING CERVICAL EROSION

(54) 发明名称: 红色诺卡氏菌细胞壁骨架制剂及其制法与治疗宫颈糜烂的用途

(57) Abstract: The present invention relates to a kind of biologic product, especially to red nocardia cell wall skeleton preparation. At first, culturing the red nocardia CGMCC No.0712, then simulated samples culturing, mycelium collecting, cell breaking, proteinase processing and removing fatty to obtain red nocardia cell wall skeleton, finally filling and lyophilizing. The said preparation comprises red nocardia cell wall skeleton and pharmaceutically acceptable carriers. The said preparation has remarkable effect on some indications, 88% cure rate and 100% total probability of efficiency, which has no damage on normal tissue, innocuous, safely, in addition, which has lesser side-effect and convenient for use.

(57) 摘要

本发明涉及一种生物制剂, 特别是红色诺卡氏菌细胞壁骨架制剂。先培养红色诺卡氏菌 CGMCC No.0712, 再经增菌培养、菌体收集、细胞粉碎、酶纯化除脂后得红色诺卡氏菌细胞壁骨架, 经配置灌装冻干而成。本发明的制剂含有红色诺卡氏菌细胞壁骨架和药学上可接受的载体。本发明的制剂对适应症的疗效显著, 治愈率达 88%, 总有效率达 100%, 对正常组织无损伤、无毒, 安全性好, 副作用小, 使用简便, 成本低的外用药物。

红色诺卡氏菌细胞壁骨架制剂及其制法与治疗宫颈糜烂的用途

技术领域

本发明涉及一种利用生物工程技术生产的微生物制剂,即红色诺卡氏菌细胞壁骨架的制剂,英文名/拉丁名:Lyophilized Nocardia Rubra Wall Skeleton Preparation for External Use,其主要组分为红色诺卡氏菌细胞骨架,该细胞壁骨架内含阿拉伯半乳聚糖、胞壁酸和粘肽等成分。本发明还涉及制备含有红色诺卡氏菌细胞壁骨架制剂的方法和检测方法,以及该制剂治疗宫颈糜烂的用途。

背景技术

宫颈糜烂是妇科最常见的慢性疾病,大约有 30%的育龄妇女患有此病,有的患者明显白带增多、腰骶酸痛和下坠感,如果局部有炎症,还会出现脓性白带,需要进行治疗。重度宫颈糜烂如不及时治疗极易转化为宫颈癌。

目前通常采用的物理疗法:有电熨、冷冻、激光和微波等方法,所述的治疗方法存在着诸如能损伤正常组织、治疗期间阴道分泌物大量增加,并伴随有腥臭味,等一个月后症状才能消退等不尽如人意之处。同时,疗效又不令人满意,还受季节限制,通常夏季还不宜采用上述的方法治疗。

目前通常采用的药物治疗方法有:搽剂、栓剂、泡腾片等,所述治疗药物存在着诸如疗效低、复发率高、副作用大、且易破坏阴道内环境的微生态平衡等缺点。

综上所述,目前在宫颈糜烂的治疗上尚缺少理想的治疗方法。众

多病人只能无奈忍受上述痛苦的治疗方法。

发明内容

为了克服现有技术的不足之处,本发明的目的在于提供一种含有红色诺卡氏菌细胞壁骨架制剂。本发明的另一目的在于提供一种制备本发明含有红色诺卡氏菌细胞壁骨架制剂的方法。

本发明的再一目的在于提供一种本发明含有红色诺卡氏菌细胞壁骨架制剂在治疗宫颈糜烂中的用途,

本发明的药物制剂对适应症疗效显著、副作用小、对局部无明显刺激症状、不损伤正常组织、并能使引导分泌物减少和性状改善、安全性好,使用简便取代进口、成本低。

为了完成本发明的目的,本发明提供一种用于治疗宫颈糜烂的制剂,其特征在于包括红色诺卡氏菌的细胞壁骨架产物。

该制剂还包括其药学上可接受的载体。所述的红色诺卡氏菌已经于 2002 年 2 月 5 日在中国微生物保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏编号为: CGMCC No. 0712。

所述的药学上可接受的载体, 包括糖类(单糖、双糖或多糖), 糖苷类(如右旋糖酐) 脂肪类(包括脂肪酸)、蛋白质类(如牛血清白蛋白、明胶), 氨基酸类(如谷氨酸钠、甘氨酸、半胱氨酸)等生化物质, 以及酯类(如聚山梨酯), 醇类(如甘油、丙二醇、甘露醇), 二甲亚砜有机溶剂, 羧酸(如柠檬酸钠), 多聚阴离子(如多磷酸盐), 表面活性剂、防腐剂、抗氧化剂等, 优选为右旋糖酐。

按照该制剂的总重量计算,所述的红色诺卡氏菌的细胞壁骨架的含量为 0.005 重量% — 99 重量%。

本发明还提供一种制备治疗宫颈糜烂制剂的方法,包括:

将保藏号为 CGMCC No.0712 的红色诺卡氏菌增菌培养、收集菌体、细胞粉碎、酶纯化,除脂后得一红色诺卡氏菌细胞壁骨架产物;

将得到的红色诺卡氏菌细胞壁骨架产物同药学上可接受的载体混合,得到一种制剂。

在该方法中,所述的药学上可接受的载体优选为右旋糖酐。按照该制剂的总重量计算,所述的红色诺卡氏菌的细胞壁骨架产物的含量为 0.005 重量% — 99 重量%。

本发明还提供一种治疗治疗宫颈糜烂的方法,其特征在于将红色诺卡氏菌的细胞壁骨架产物直接涂抹在患病部位。

本发明使用的微生物:

用来生产本发明所述产品的是一种属于诺卡氏菌属的菌株,其具有生产红色诺卡氏菌细胞骨架制剂的能力。红色诺卡氏菌 (*Nocardia rubra*) Nr-8206 就具有上述特性,适于生产本发明所述的产品。该菌株经在甘油琼脂培养基上, 33℃ 培养 5 天而得,该菌株于 2002 年 2 月 5 日在中国微生物保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏编号为: CGMCC No.0712。

本发明菌株的菌学特征:

1、培养特性

接种于 pH7.2~7.5 的甘油琼脂培养基, 33℃ 培养 48 小时,菌种

隆起，呈橘黄色，表面干燥皱起，外观呈砂粒状，略有光泽。接种环接触易碎，在实验室条件下未见形成气生菌丝体。

2、菌体形态特征

革兰氏染色阳性，抗酸性染色阴性。菌体呈分枝状有横隔膜，形成纤细的菌丝体。整个菌丝分裂成不规则柱形短粗细胞，培养 5 天菌体呈短杆状和球形。

3、生化反应

发酵甘露醇、山梨醇；不发酵乳糖、麦芽糖、蔗糖、菊糖、鼠李糖、阿拉伯糖、福寿草醇、蕈糖、甘露糖、棉子糖、半乳糖、淀粉、动物胶；硝酸盐还原阳性。

符合以上标准者可用于生产

培养与提取方法：

用红色诺卡氏菌属通过微生物生产方法，可以培养本发明保藏的菌株，并经传代、扩增、超声波粉碎，提取获得该细胞壁骨架、酶纯化、有机溶剂除脂后，再加入适量的赋形剂后冻干制成。其培养方式既可为固体培养，也可为液体培养。

对培养基中的营养源并无特殊的规定，可使培养基中含有通常用于微生物培养的碳源、氮源及其它营养源。其中碳源可分为淀粉、糊精、甘露醇、蔗糖、甘露糖、乳糖、山梨醇、麦芽糖、福寿草醇等。氮源可为肉膏、蛋白胨、铵盐、硝酸盐以及其它有机或无机含氮化合物。至于其它营养源则可适当添加一些无机盐类。例如磷酸盐类。

对温度、时间等培养条件并无严格的限制，以利于使用菌的生长为准，并以选择使其产量最高的条件为好。例如培养基的 pH 值以接近中性为好，培养温度宜在 22-37℃，当然这些培养基的组分、氢离子浓度、培养温度等均应根据所使用的菌株不同及外部条件等进行适当的调节，以获得最好的效果。

通过微生物的培养，将本发明的菌株接种在甘油琼脂基上培养菌种，经检定合格的菌种增菌培养、菌体收集、细胞粉碎后经酶纯化、除脂后，即为本发明产品的有效成分细胞壁骨架产物，添加本领域技术人员公知的药物载体，例如药用微生物制剂所能接受的赋形剂，优选如右旋糖酐，灌装后冻干为成品。

得到的本发明产品的剂量可以为，例如，但不限于，每瓶为 0.5ml，其组成与配比如下：

红色诺卡氏菌细胞壁骨架	5—1000 μ g
右旋糖酐	0.01—100mg

经检测其菌种、原液、成品质量指标见下表：

种子批的检定:

检验内容	检验标准	检验结果
培养特性	菌种隆起, 呈橘黄色, 表面干燥皱起, 外观呈砂粒状, 略有光泽。接种环接触易碎, 在实验室条件下未见形成气生菌丝体。	菌种隆起, 呈橘黄色, 表面干燥皱起, 外观呈砂粒状, 略有光泽。接种环接触易碎, 在实验室条件下未见形成气生菌丝体。
菌体形态特征	革兰氏染色阳性, 抗酸性染色阴性。菌体呈分枝状有横隔膜, 形成纤细的菌丝体。整个菌丝分裂成不规则柱形短粗细胞, 培养5天菌体呈短杆状和球形。	革兰氏染色阳性, 抗酸性染色阴性。菌体呈分枝状有横隔膜, 形成纤细的菌丝体。整个菌丝分裂成不规则柱形短粗细胞, 培养5天菌体呈短杆状和球形。
生化反应	发酵甘露醇、山梨醇; 不发酵乳糖、麦芽糖、蔗糖、菊糖、鼠李糖、阿拉伯糖、福寿草醇、蕈糖、甘露糖、棉子糖、半乳糖、淀粉、动物胶; 硝酸盐还原阳性。	发酵甘露醇、山梨醇; 不发酵乳糖、麦芽糖、蔗糖、菊糖、鼠李糖、阿拉伯糖、福寿草醇、蕈糖、甘露糖、棉子糖、半乳糖、淀粉、动物胶; 硝酸盐还原阳性。

原液检定:

检验内容	检验标准	检验结果
固体总量测定	固体总量应在0.9%~1.4%之间	固体总量应在0.9%~1.4%之间
糖含量测定	每毫升应不低于2.5mg。	每毫升应不低于2.5mg。
胞壁酸测定	每毫升应不低于200 μ g。	每毫升应不低于200 μ g。
蛋白质残余量测定	蛋白质残余量应不高于30%。	蛋白质残余量应不高于30%。
脂质残余量测定	脂质残余量应不高于5%。	脂质残余量应不高于5%。
RNA、DNA 残余量测定	RNA、DNA 残余量测定应分别	RNA、DNA 残余量测定应分别

	不高于 5%	不高于 5%
TritonX—100 残余量 测定	TritonX—100 残余量, 应不 高于 5%	TritonX—100 残余量, 应不 高于 5%
无菌试验	阴性	阴性

成品检定:

检验内容	检验标准	检验结果
物理性状	本品为白色疏松体或粉末	白色疏松体
水分含量	$\leq 6\%$	2.74%
溶解度	加氯化钠注射液在 1 分钟内溶解	合格
糖鉴别试验	溶液呈蓝绿色	溶液呈蓝绿色
胞壁酸含量	$\geq 1.0 \mu\text{g}/\text{瓶}$	$1.64 \mu\text{g}/\text{瓶}$
小鼠异常毒性 实验	在观察期内, 小鼠应全部健在, 无异常反应, 到期每只小鼠体重增加, 判为合格。	合格
豚鼠异常毒性 实验	在观察期内, 豚鼠应全部健在, 无异常反应, 到期每只豚鼠体重增加, 判为合格。	合格
效力实验	吞噬百分率: $\geq 10\%$	吞噬百分率: 43.6%
	吞噬指数: ≥ 0.15	吞噬指数: 0.63
无菌试验	阴性	阴性
检验结论	合格	

本发明与现有技术相比, 由于是利用微生物的细胞壁骨架作为有效成分, 制成的生物制剂, 该细胞壁骨架是一种免疫增强剂, 它能增强机体抗肿瘤作用和对某些病毒和细菌感染具有保护作用, 增强巨噬细胞的吞噬能力并被一系列的实验和医院临床实验所证明, 对适应症取得了令人满意的疗效, 治愈率达 88%, 总用效率达 100%, 对正常

组织无损伤、无毒、安全性好，副作用小，是一种高效、安全、使用简便，成本低的治疗宫颈糜烂的外用药物。

本发明所使用的红色诺卡氏菌 Nr-8206, 于 2002 年 2 月 5 日在北京中关村, 中国微生物保藏管理中心普通微生物中心包藏, 登记编号为: CGMCC No. 0712, 并经过检测表明所寄存的菌株存活, 无失活者。

1. 一般药理试验

1)、用相当于临床剂量的 20、40、80 倍静脉注射后, 对麻醉猫血压、呼吸、心率和心电均未产生明显影响;

2)、用相当于临床剂量的 1000 倍静脉注射后, 对小鼠的协调运动和学习记忆功能未产生明显的影响。

从而可见本发明的制剂对动物精神、精神系统、心血管系统、呼吸系统均无明显影响。

2. 安全试验 (无菌、毒性)

1)、无菌试验结果阴性, 证明无菌试验合格;

2)、通过小白鼠急性毒性试验: 实验组分别以皮下注射及腹腔注射方式给小白鼠本发明的制剂, 其剂量是人用量的 5 倍, 对照组以无菌生理盐水 0.5ml/支代替品, 连续观察 7-8 天, 小鼠状态良好, 体重均较注射前增加, 均无异常, 剖检小鼠各脏器均无异常变化, 毒性试验合格。

3. 长期毒性试验

以高于临床剂量 30 倍的剂量, 每日一次, 连续阴道给试验用狗本发明的制剂三个月, 未发现狗有毒性作用, 心电图、各项血液生化

及血液指标均在正常范围内与给药前比较均未发现明显毒性变化，停药两周后，留待观察的狗的各项指标亦正常，未见到延迟毒性反应，从而表明本发明的制剂在所用剂量，时间范围内无毒性作用。

4. 药品稳定性试验

在生产工艺无改变情况下，药品在常温下，放置 1、2、3 个月、8 个月、14 个月，21 个月时，该制剂中含有的丙氨酸、胞壁酸其含量与该产品生产当月时相比无明显差异，从而说明在这样的条件下，制剂的稳定性好；又通过效力试验表面与该三批当月时的吞噬率和吞噬指数均无明显变化。表明产品稳定性好，冻干后可常温保存二年。

5. 免疫力试验

本发明的制剂表面免疫吞噬鸡红细胞能力很强，其吞噬率为 $\geq 10\%$ ，吞噬指数为 ≥ 0.15 ，而右旋糖酐其吞噬率和吞噬指数较生理盐水都低，从而说明本发明的制剂免疫吞噬能力很强，而右旋糖酐、生理盐水无此作用。

具体实施方式

以牛肉膏 2.0—6.0g、蛋白胨 4.0—10.0g、氯化钠 2.0—6.0g、琼脂 10.0—20.0g、甘油 4.0—10.0ml、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.1—0.5g、蒸馏水 500ml—1000ml 配置成甘油琼脂培养基，pH 7.0-8.0 灭菌后，将红色诺卡氏菌 Nr-8206，CGMCC No.0712 接种于该培养基中，28—36℃培养 2—8 天；经检定合格的菌种培养后接种于甘油培养基上，28—36℃培养 2—8 天。用无菌蒸馏水洗下菌苔后，经检定合格的菌

液 1000 - 5000 rpm 5—40 分钟离心分离，收集菌体洗 1—7 次并将菌体称湿重，置-70℃—20℃保存。经过纯菌试验，无杂菌生长者可以使用，取 1—5 份重量的湿菌与 1—5 份重量的无菌蒸馏水经振荡后用超声波粉碎机进行粉碎，每粉碎 5—30 分钟，革兰氏染色镜检染色，显微镜下检查粉碎情况，每个视野有形菌不得超过 15 个，检查不少于 5 个视野均达到此标准为合格。粉碎合格后用 1000—2000 rpm 离心 5—40 分钟去沉渣，上清液-70℃—10℃保存备用。配置磷酸盐 PBS 缓冲溶液 pH 7.0—8.0。配好的 PBS 缓冲溶液经灭菌后备用，然后对细胞壁骨架进行提取，取上清液 100—500ml 以 10000—20000 rpm 离心 5—40 分钟弃上清液，沉淀与 100—500 ml 溶有其浓度为 100—500 μ g/ml 的 DNA 酶、RNA 酶的 PBS 缓冲溶液混合后，15—30℃0.5—3 小时后用 10000—20000 rpm 离心 5—40 分钟弃上清液，其沉淀用 PBS 缓冲溶液洗 1—5 次。并经 RNA 酶、DNA 酶消化率检查，其沉淀用 0.5—5% 的聚乙二醇辛基苯基醚稀释至 100—500ml，15—30℃12—48 小时后，经 10000—20000rpm 离心 5—40 分钟去上清液，沉淀用 PBS 缓冲溶液洗 1—5 次。所得沉淀用链酶蛋白酶（50—200 μ g/ml）与胰蛋白酶（1.0—5.0mg/ml）的溶液稀释至 100—500ml，18—30℃8—24 小时后，经 10000—20000rpm 离心 5—40 分钟去上清液，沉淀用 PBS 缓冲溶液洗 1—5 次。留样 0.5ml 检测蛋白残余量。有机溶剂除脂：上步所得的沉淀用丙酮稀释至 100—500 ml，18—30℃12—48 小时，10000—20000rpm 离心 5—40 分钟后，用 PBS 缓冲溶液洗 1—5 次，然后其所得沉淀用乙醚与乙醇的 1：0.5—1：5 混合液至 100—

500ml, 18—30℃ 12—18 小时, 用 10000—20000rpm 离心 5—40 分钟后, 用 PBS 缓冲溶液洗 1—5 次, 并检测余脂率合格。所得沉淀即为细胞壁骨架, 称湿重后按 10—100mg/ml 用无菌蒸馏水稀释, 灭菌后置 -70℃—10℃ 保存待用。灌装冻干工序: 按如下配方配置半成品 (以配置 5000ml 半成品为例)。红色诺卡氏菌细胞骨架 50—10000mg、右旋糖酐 0.1—1000g、加无菌注射用水至 5000ml, 半成品配置好后, 用磁力搅拌器使其混合均匀。灌装每瓶 0.5ml, 灌装后冻干。并经成品检验使其每瓶含红色诺卡氏菌细胞骨架 5—1000 μ g、右旋糖酐 0.01—100mg。本发明的产品在常温下保存期二年。

实验例:

本发明的产品在沈阳市妇婴医院进行临床实验, 其结果如下:

材料与amp;方法

一、研究方法: 开放性多中心随机对照研究

(一) 受试对象选择条件:

1. 年龄在 23-45 岁之间, 已婚非孕妇女。
2. 宫颈有糜烂, 已除外癌变者。
3. 月经规律周期不少于 25 天者。
4. 能坚持完成疗程者。
5. 受试期间不用其他治疗方法。

(二) 受试对象排除条件:

1. 阴道细胞学涂片检查结果为 II_B 以上者。

2. 宫颈有癌变者。
3. 有各种阴道炎或急性、亚急性盆腔炎者。
4. 产后 3 个月以内。
5. 多种药物有过敏史者。

(三) 受试对象例数:

总共为 75 例, 按 2: 1 随机表分配在试验组 50 例, 对照组 25 例。

(四) 使用的药物和方法:

1. 试验组:

药物为红色诺卡氏菌细胞壁骨架制剂, 可以是一种擦剂, 规格为每安瓶内含细胞壁骨架 (以下简称 Nr-CWS) 60 μ g 冻干粉, 为申请人单位的研制品, 批号 950321。

使用方法: 除去宫颈表面分泌物后, 用 2.0ml 生理盐水溶解所述的擦剂 60 μ g 冻干粉后, 用药物浸湿无菌带尾绳棉球置于宫颈糜烂处, 24 小时后由患者自行取出。每周上药 2 次, 共 6 次。

2. 对照组:

药物为爱宝疗浓缩液, 每克含爱宝疗 360mg, 为德国 BYK 公司产品, 批号: J940475。

使用方法: 首先用 1: 5 稀释液冲洗宫颈, 用纱布块清除受试者的宫颈粘液及阴道内分泌物, 然后将浸透浓缩液的棉花块紧贴糜烂处三分钟后取出, 此时糜烂面全已变白。上述治疗每周二次, 共 6 次。

试验组和对照组的受试者均于月经干净后 2-3 天开始治疗。

(五) 宫颈糜烂诊断标准

1. 分度

轻度：糜烂面小于整个宫颈面积的 $1/3$ 。

中度：糜烂面占整个宫颈面积的 $1/3-2/3$ 。

重度：糜烂面占整个宫颈面积的 $2/3$ 以上。

2. 分型：按糜烂深浅程度分为：

单纯型：糜烂表面平滑。

颗粒型：糜烂表面呈乳头状突起，不平。

（六）观察事项：

1. 用药前：

- （1）常规询问病史，做妇科检查。
- （2）阴道分泌物检查清洁度，分为 I、II、III 度，查滴虫霉菌。
- （3）做疑难到细胞学涂片检查，除外癌变。
- （4）目测宫颈糜烂面积，按诊断标准进行分度、分型。
- （5）查血、尿常规，肝功能（GPT 或 ALT）肾功能（BUN、Cr）。
- （6）安排专人进行治疗和观察，以便统一标准。

2. 用药期间：

- （1）治疗期间建议患者避免性生活。
- （2）询问药物的全身和局部的不良反应的情况。
- （3）每次上药前注意观察外阴、阴道局部的不良反应，白带变化（性状和量）。宫颈糜烂局部变化（范围和深度）。

3. 治疗后

下次月经后来复查，继续询问症状，观察宫颈糜烂局部变化（包

括面积和深浅), 阴道分泌物量和性状变化, 并进行疗效判定。最后一次上药后, 重复治疗前阴道的细胞学检查和实验市检查(血、尿常规、肝、肾功能)。

(七) 疗效判定标准

痊愈: 糜烂面小时, 宫颈官话, 症状小时。

有效: 上下唇糜烂面直径缩小 2 mm, 变浅, 症状减轻。

无效: 自觉症状和体征无改变。

恶化: 糜烂面扩大、变深、症状加重。

(八) 数据处理和统计方法

统一方案、统一表格, 统一数据处理。统计方法 X^2 检验。

结果

1. 基本情况比较: 门诊宫颈糜烂患者按随机表 50 例应用本发明的制剂(擦剂)治疗为试验组, 25 例应用爱宝疗治疗为对照组。两组受试对象的年龄、初潮年龄、孕次、产次等基本情况见表 1。

表 1 受试对象的年龄、初潮年龄、孕次、产次的比较

	例数	年龄		初潮		孕次		产次	
		均值	标准差	均值	标准差	均值	标准差	均值	标准差
实验组	50	35.88	6.88	14.14	0.95	1.24	0.48	0.94	0.24
对照组	25	34.44	5.87	14.16	0.94	1.16	0.37	1.00	
两组间 差异的 显著性		P=0.3737		P=.09315		P=0.4349		P=0.2205	

两组间年龄最小 24 岁, 最大 45 岁, 由上表可见两组受试对象基本情况无显著性差异, 具有可比性 ($P>0.005$)。

2. 临床表现

2.1 两组患者宫颈糜烂分度, 分型情况见表 2、表 3。

表 2 两组患者宫颈糜烂分度、分型比较

	用药前			正常	第三次复查		
	轻度	中度	重度		轻度	中度	重度
试验组	21	24	5	44	6		
对照组	8	10	7	19	5	1	

试验组用药前与第三次复查的显著性检验（精确概率）($P < 0.01$) = 。对照组同试验组相似 ($P < 0.01$) = 。详见表 11，以下相同。

由上表可见试验组轻度占 42%，中度占 48%，重度占 10%，对照组轻度占 32%，中度占 40%，重度占 24%，治疗后试验组宫颈正常占 88%，轻度占 12%，对照组宫颈正常占 76%，轻度占 20%，中度占 4%，从糜烂度所占有的百分比上看试验组疗效优于对照组。

表 3 宫颈糜烂分型的对比

	用药前			正常	第三次复查		
	单纯型	颗粒型	乳头型		单纯型	颗粒型	乳头型
试验组	30	17	3	44	2	3	1
对照组	10	11	4	19	2	2	2

注：宫颈糜烂分度及分型两表中：“正常”一项是针对疗效中填入“0”而设计的。试验组用药前与第三次复查的显著性检验（精确概率）($P < 0.01$)。

由表 3 可见（1）治疗前试验组单纯型占 60%，颗粒型占 34% 乳头型占 6%。对照组单纯型占 40%，颗粒型占 44%，乳头型占 16%。治疗后试验组单纯型占 4%，颗粒型占 6%，乳头型占 2%，正常者为 88%。对照组单纯型占 4%，颗粒型占 4%，乳头型占 8%，正常占 76%。试验组疗效优于对照组。

2.2 用药前后白带量、白带性状见表 4、表 5

表 4 白带量的对比

	用药前			第一次复查			第二次复查			第三次复查		
	正常	稍多	很多	正常	稍多	很多	正常	稍多	很多	正常	稍多	很多
试验组	27	21	2	45	4	1	50			50		
对照组	13	7	5	18	6	1	21	4		23	2	

试验组用药后与第三次复查的显著性检验(精确概率)($P<0.01$)。对照组与试验组相似($P<0.01$)。由上表可见:(1)治疗前试验组中白带量正常者占 54%,稍多占 42%,很多占 4%。对照组正常占 52%,稍多占 28%,很多占 20%。(2)治疗后白带量正常占 100%,无稍多或很多。对照组正常占 92%,稍多占 8%。试验组或对照组在治疗前后白带量有非常显著差异($P<0.01$),两组中白带量所占百分比看,试验组对占 90%,而对照组正常者分别为(72%、82%)。

表 5 白带性状的对比

	用药前		第一次复查		第二次复查		第三次复查	
	正常	脓性	正常	脓性	正常	脓性	正常	脓性
试验组	44	6	48	2	49	1	49	1
对照组	18	7	23	2	25		25	

试验组用药前与第三次复查的显著性检验(精确概率)($P<0.01$)。对照组与试验组相似($P<0.01$)。

由表 5 看(1)治疗前试验组白带正常占 88%,脓性占 12%,对照组白带正常占 72%,脓性占 24%。治疗后试验组白带正常占 98%,脓性占 2%,对照组白带正常占 100%。由此可见,两组在治疗前后白带性状改善上均存显著差异($P<0.01$)。试验组在改善白带性状上正常者为 98%,对照组为 100%,两者无差异($P>0.05$)。白带量和性状常为患者主诉症状,估计与此有关。

2.3 阴道清洁度，宫颈涂片，巴氏分级见表 6

表 6 阴道清洁度，宫颈涂片，巴氏分级

	阴道清洁度						巴氏分级					
	用药前			第三次复查			用药前			第三次复查		
	I 度	II 度	III 度	I 度	II 度	III 度	I 度	II 度	III 度	I 度	II 度	III 度
试验组	22	28		47	3		30	20		49	1	
对照组	14	11		23	2		13	12		25		

经统计两组间阴道清洁度和宫颈涂片巴氏分级，在治疗前生 P 值均小于 0.01，差异均非常显著。提示药物的安全性和实用价值。

3、疗效评定见表 7

表 7 疗效评定

	痊愈	有效	无效
试验组	44	6	0
对照组	19	6	0

从表 7 可见试验组治愈率占 88%，有效率占 12%，总有效率 100%，对照组痊愈率占 72%，有效率占 28%，总有效率为 100%，经 X² 统计检验两者判别不显著。

4、安全性和不良反应见表 8

表 8 不良反应

	总例	有	无
试验组	50	0	50
对照组	25	0	25

试验组 50 例，对照组 25 例，均无一例出现副反应，提示本发明的制剂（擦剂）应用于临床的安全、可靠性。

治疗前后实验室指标检查结果见表 9、表 10

表 9 治疗前后实验室指标检查结果

例数	Bb(g/L)	RBC(10/L)	WBC(10/L)	BUN(mg/Dl)	Cr(mg/Dl)
均值±标准差	均值±标准差	均值±标准差	均值±标准差	均值±标准差	均值±标准差
试验组 治疗前 50	133.80 ± 9.02	3.95 ± 0.23	7.03 ± 1.95	4.45 ± 2.22	60.07 ± 18.49
治疗后 50	137.56 ± 3.69	3.96 ± 0.46	7.29 ± 1.23	4.20 ± 1.55	65.85 ± 21.88
治疗前后差异的 P 值	P=0.0014	P=0.0806	P=0.1104	P=0.5527	P=0.1013
对照组 治疗前 25	137.76 ± 3.49	4.00 ± 0.15	6.80 ± 1.38	4.25 ± 1.26	74.82 ± 23.80
治疗后 25	138.52 ± 4.45	4.03 ± 0.13	7.20 ± 1.24	3.88 ± 1.37	68.23 ± 24.48
治疗前后差异的 P 值	P=0.1119	P=0.4301	P=0.3115	P=0.3791	P=0.3205

表 10 试验组与对照组治疗前后各项指标差异的显著性检验:

	Hb	RBC	WBC	BUN	Cr
治疗前	P=0.0704	P=0.3963	P=0.6048	P=0.8684	P=0.007
治疗后	P=0.122	P=0.964	P=0.7019	P=0.5754	P=0.7377

用药前后各项指标的观察

75 例受试者用药前后测血红细胞, 红细胞已计数, 白细胞已计数, 转氨酶, 血尿素氮, 血肌肝, 变化如表 9 所示, 两组中各项指标相比较, 大部分指标统计差异无显著性 ($P>0.05$), 少数指标差别虽有显著性, 但其均值均在正常范围内。结果详见表 9、表 10。结果说明试验组与对照组所用的药物均是安全的。

6. 用药前后各项指标的卡方显著性见表 11

	白带过多	宫颈糜烂分度	宫颈糜烂分型	白带性状	引导清洁度	巴氏分级
实验组用药 前与第三次 复查差异的 显著性检验 (精确概率法)	P<0.05	P<0.01	P<0.01	P>0.05	P<0.01	P<0.01
对照组用药 前与第三次 复查差异的 显著性检验	P<0.05	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01

(精确概率法)

实验组与

对照组用药 $P > 0.05$ $P > 0.02$ $P > 0.05$ $P > 0.05$ $P > 0.05$ $P > 0.05$

前差异的显著

性检验 (精确

概率法)

实验组与对

照组第三次 $P > 0.05$ $P > 0.05$ $P > 0.05$ $P > 0.05$ $P > 0.05$ $P > 0.05$

复查差异的

显著性检验

(精确概率法)

从本试验的结果来看,两种药品均有显著的疗效,尤其是实验组治疗宫颈糜烂更是取得了令人满意的疗效,治愈率达 88%,总有效率达 100%,两者均能使阴道分泌物减少和性状改善。两种药物的副作用反应均很小,对局部无明显刺激症状,不损伤正常组织,安全性好,两者均为高效安全使用简便的治疗宫颈糜烂的外用药。同时给药方式合理,带尾棉球紧贴于糜烂面作用充分,并自行取下较方便,患者十分乐于接受。

因此, 可以认为本发明的制剂(擦剂)是为宫颈糜烂治疗提供了新的途径,又具有防癌作用的良药,值得推广。

对于面积大的颗粒型、乳头型宫颈糜烂,一个疗程不能完全治愈者,可考虑使用 2—3 个疗程,以取得更好的治疗效果。

申请人或代理人档案号 **CPC31860**

国际申请号

PCT/CN03/0075 1**关于微生物保藏的说明**

(细则 13 之二)

A. 对说明书第 <u>2</u> 页, 第 <u>14</u> 行所述的微生物的说明	
B. 保藏事项 红色诺卡氏菌	
保藏单位名称 中国微生物保藏管理委员会普通微生物中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 中国北京中关村中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心	
保藏日期 2002 年 2 月 5 日	保藏号 CGMCC No.0712
C. 补充说明 (必要时) 本栏内容有补充页 <input type="checkbox"/>	
D. 本说明是为下列指定国作的 (如果说明不是为所有指定国而作的)	
E. 补充说明 (必要时)	
下列说明将随后向国际局提供 (写出说明的类别, 例如: “保藏的编号”)	

由受理局填写

☒ 本页已经和国际申请一起收到

受权官员

由国际局填写

☐ 国际局收到本页日期

受权官员

权利要求书

1. 一种用于治疗宫颈糜烂的制剂，其特征在于包括红色诺卡氏菌的细胞壁骨架产物。
2. 根据权利要求 1 所述的制剂，其特征在于该制剂还包括其药学上可接受的载体。
3. 根据权利要求 1 所述的制剂，其特征在于所述的红色诺卡氏菌已经于 2002 年 2 月 5 日在中国微生物保藏管理委员会普通微生物中心保藏，保藏编号为：CGMCC No. 0712。
4. 根据权利要求 2 所述的制剂，其特征在于所述的药学上可接受的载体，包括糖类（单糖、双糖或多糖）、糖苷类（如右旋糖酐）、脂肪类（包括脂肪酸）、蛋白质类（如牛血清白蛋白、明胶）、氨基酸类（如谷氨酸钠、甘氨酸、半胱氨酸）等生化物质，以及酯类（如聚山梨酯），醇类（如甘油、丙二醇、甘露醇）、二甲亚砜等有机溶剂、羟羧酸（如柠檬酸钠）、多聚阴离子（如多磷酸盐），表面活性剂、防腐剂、抗氧化剂等，优选为右旋糖酐。
5. 根据权利要求 2 所述的制剂，其特征在于按照该制剂的总重量计算，所述的红色诺卡氏菌的细胞壁骨架的含量为 0.005 重量% — 99 重量%。
6. 一种制备治疗宫颈糜烂制剂的方法及检测方法，包括：
将保藏号为 CGMCC No.0712 的红色诺卡氏菌增菌培养、收集菌体、细胞粉碎、酶纯化，除脂后得一红色诺卡氏菌细胞壁骨架产物；

将得到的红色诺卡氏菌细胞壁骨架产物同药学上可接受的载体混合，得到一种制剂。

质量检测方法包括红色诺卡氏菌种子批检测方法，红色诺卡氏菌细胞壁骨架原液的检测方法，红色诺卡氏菌细胞壁骨架制剂成品的检测方法。

7. 根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于所述的药学上可接受的载体优选为右旋糖酐。
8. 根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于按照该制剂的总重量计算，所述的红色诺卡氏菌的细胞壁骨架产物的含量为 0.005 重量% — 99 重量%。
9. 一种治疗宫颈糜烂的方法，其特征在于将有效剂量的红色诺卡氏菌的细胞壁骨架产物直接涂抹在患病部位。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN03/00751

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷: A61K35/78; A61P31/00

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

I IPC⁷: C07K ;C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, PIR, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN1094288A, (FUJI-N) FUJIAN PROV MICROORGANIC INST, 02.11 月 1994 (02.11.94), Full text	1-9
A	US4505903A, (RIBI-N) RIBI IMMUNOCHEM RES, 19.3 月 1985 (19.03.85), Full text	1-9
A	GB2149301A, (RIBI-N) RIBI IMMUNOCHEM RES, 12.6 月 1985 (12.06.85), Full text	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22. Sep. 2003 (22.09.03)

Date of mailing of the international search report

16 OCT 2003 (16.10.03)

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

Wang PengFei

Telephone No. 86-10-62098145

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

application No.

PCT/CN03/00751

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
GB2149301A	1985/06/12	- BE900650 A	19850321
		- FR2552326 A	19850329
		- SE8404707 A	19850324
		- AU3340084 A	19850328
		- NL8402902 A	19850416
		- NO8403776 A	19850415
		- DK8404466 A	19850324
		- ZA8407405 A	19850318
		- FI8403716 A	19850324
		- JP60120817 A	19850628
		- HU35521 A	19850729
		- DE3434766 A	19860430
		- ES8608872 A	19861216
		- DE3434766 C	19870514
		- US4663306 A	19870505
		- KR8700843 B	19870425
		- AT8403023 A	19871015
		- JP62054775B	19871117
		- CH664897 A	19880415
		- CA1244765 A	19881115
		- IL73034 A	19881115
		- IT1179444 B	19870916

国际检索报告

国际中请号
PCT/CN03/00751

A. 主题的分类		
IPC ⁷ : A61K35/78; A61P31/00		
按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)		
IPC ⁷ : C07K ;C12N; A61K; A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)		
GenBank, EMBL,DDBJ,PDB, PIR,WPI		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	CN1094288A, 福建省微生物研究所, 02.11 月 1994 (02.11.94), 全文	1-9
A	US4505903A, (RIBI-N)RIBI IMMUNOCHEM RES, 19.3 月 1985 (19.03.85), 全文	1-9
A	GB2149301A, (RIBI-N)RIBI IMMUNOCHEM RES, 12.6 月 1985 (12.06.85), 全文	1-9
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的专用类型: “A” 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利 “L” 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了解构成发明基础的理论或原理 “X” 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性 “&” 同族专利成员的文件		
国际检索实际完成的日期 22.09 月.2003(22.09.03)		国际检索报告邮寄日期 16.10月2003(16.10.03)
国际检索单位名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局专利局 中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)		授权官员: 
传真号: 86-10-62019451		电话号码: 86-10-62093145

国际检索报告
同族专利成员的情报

国际申请号

PCT/CN03/00751

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
GB2149301A	1985/06/12	- BE900650 A	19850321
		- FR2552326 A	19850329
		- SE8404707 A	19850324
		- AU3340084 A	19850328
		- NL8402902 A	19850416
		- NO8403776 A	19850415
		- DK8404466 A	19850324
		- ZA8407405 A	19850318
		- FI8403716 A	19850324
		- JP60120817 A	19850628
		- HU35521 A	19850729
		- DE3434766 A	19860430
		- ES8608872 A	19861216
		- DE3434766 C	19870514
		- US4663306 A	19870505
		- KR8700843 B	19870425
		- AT8403023 A	19871015
		- JP62054775B	19871117
		- CH664897 A	19880415
		- CA1244765 A	19881115
		- IL73034 A	19881115
		- IT1179444 B	19870916